

⑫ 公表特許公報(A)

昭61-502420

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公表 昭和61年(1986)10月23日

G 01 N 21/77
33/5438305-2G
L-7906-2G

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 6(1)

(全12頁)

⑭ 発明の名称 化学試験方法に使用するためのデバイス

⑯ 特 願 昭60-502718

⑰ 出 願 昭60(1985)6月12日

⑱ 翻訳文提出日 昭61(1986)2月12日

⑲ 国際出願 PCT/GB85/00259

⑳ 国際公開番号 WO86/00141

㉑ 国際公開日 昭61(1986)1月3日

優先権主張 ㉒ 1984年6月13日 ㉓ イギリス(GB) ㉔ 8415018

㉕ 1984年6月13日 ㉖ イギリス(GB) ㉗ 8415019

㉘ 発 明 者 シャンクス, イアン・アリグザ
ンダーイギリス国、ベドフォード・エム・ケイ・43・7・ティー・ワイ、
ベイヴンハム、ザ・ベリー・56

㉙ 発 明 者 スミス, アラン・マーティン

イギリス国、ベドフォード・エム・ケイ・43・7・ジエイ・ユー、
カールトン、ザ・マーシュ・23㉚ 出 願 人 ユニバー・ナムローゼ・
ベンノートシャープオランダ国、ロッテルダム、バージミースターズ・ヤコブプレー
ン・1

㉛ 代 理 人 弁理士 川口 義雄

㉜ 指 定 国 AU, JP, US

請 求 の 範 囲

- (1) 各々が毛細管作用によりキャビティ内に試料液体を流入させるに十分小さい大きさを有している1つ又は複数のキャビティを有する特異的反応性試料収集及び試験デバイスであつて、キャビティ表面はデバイスで実施すべき試験に適する固定化試薬を有しており、前記表面は光伝導導波管として作用しキャビティの壁を形成する透明な固体プレートの表面であり、前記プレートは実質的に光学的になめらかでプレートの平面を横切るエッジを有しているデバイス。
- (2) 導波管の残りのエッジが光吸収性物質で被覆されている請求の範囲1のデバイス。
- (3) 固定化試薬を担持する導波管表面が更に、インターフェースに接近して位置するはかない波により導波管境界を横切る光の移動を増強するための物質の薄層を有している請求の範囲1又は2のデバイス。
- (4) 導波管の表面上に担持された固定化試薬が例えば抗原又は抗体のような生化学的特異的結合剤からなる請求の範囲1、2又は3のデバイス。
- (5) キャビティの表面が放出可能な試薬の被膜をも有している請求の範囲1〜4のいずれかのデバイス。

- (6) 導波管がソーダガラス又はアクリルプラスチックのようなガラス又はプラスチック材料からなる請求の範囲1〜5のいずれかのデバイス。
- (7) プレート間に毛細管の大きさの薄い平らなキャビティを残すような関係の間隔で接合した透明プレートの結合構造からなる請求の範囲1〜6のいずれかのデバイス。
- (8) 更に操作ピース又はホルダーを含む請求の範囲1〜7のいずれかのデバイス。
- (9) (a) 多数のデバイスの一部を提供すべき透明シート材料の表面上に固定化した特異的反応性被膜を形成し、(b) 多数のデバイスの各デバイスに、前記の被覆したシート材料と共に特異的反応性被膜と接触してある量の試料液体を毛細管現象で収集し保持するための大きさの毛細管のキャビティを提供する追加構造を形成し、そして(c) 各々が1つ又は複数の試料収集及び試験デバイスを提供する部分にシート材料を分離する、ステップからなる特異的反応性試料収集及び試験デバイスの製造方法。
- (10) 特異的反応性被膜が例えばパッチの2次元アレイのような例えば個別の部分のパターンに分かれている請求の範囲9の方法。

- 011 先ず連続した被膜を形成し、次にその部分を除去して例えば個別の部分のアレイのような所望のパターンを設けることによりパターンを形成するパッチを製造する請求の範囲10の方法。
- 012 特異的反応性被膜が放出可能な試薬の被膜、例えば放出可能な抗原又は抗体又はその誘導体の被膜であるか、又は共有結合した抗原又は抗体又は免疫接着剤を形成するその誘導体のような固定化物質である請求の範囲9の方法。
- 013 追加構造が、適切な結合接着剤により第一のシート材料と結合している別のシート材料であり、毛細管現象によりシート間の試料液体が取り上げられるように例えば約1mm未満の毛細管空間によりそこから空隙を有している請求の範囲9の方法。
- 014 デバイスが、そこに試料液を^(体)装填又は適用でき、そこからキャピタリに流入させうる外表面を有している請求の範囲9の方法。
- 015 毛細管セル内又はセルへの入口通路内にあるフィルター又は透析膜のような試料濃縮手段又は選択性バリアーを更に含んでいる請求の範囲1のデバイス。
- 016 導波管表面上にありかつ表面プラズモン共鳴効果を示しう

る、約50nmの厚さまでの銀被膜のような伝導性物質の薄い被膜の上に固定化試薬が重っている請求の範囲1のデバイス。

- 017 薄層材料がフッ化マグネシウム又はシリカからなる請求の範囲3のデバイス。
- 018 毛細管セルの液体内容物を電気的に測定するための電極構造を更に含む請求の範囲1のデバイス。
- 019 導波管が、入口開口、光学的になめらかな構造光出口のエッジ、又は鋳造した液体入口チャネルのような鋳造表面の特性を適宜有している正確なプラスチック鋳造物である請求の範囲1のデバイス。
- 020 添付の記載及び図面の1つ又は複数の特徴の1つ以上を特徴とする請求の範囲1又は9のデバイス又は方法。

明 細 書

化学試験方法に使用するためのデバイス

本発明は化学的（特に生化学的又は臨床的）試験方法に使用するデバイス、その製造方法及び前記デバイスの使用に関する。

ある実施態様では、デバイスは特異的結合アッセイ方法に使用することを意図したものであり、前記アッセイ方法の中の重要なグループは免疫アッセイ方法で構成されている。この免疫アッセイ、特に酵素結合免疫アッセイとの例は欧州特許第0042755号明細書、英国特許第2074727号明細書、英国特許第2086041号明細書及び英国特許第1548741号明細書中に引用されている。

従来は、アッセイの反応液用の種々の他の液体容器の中から、慣例的には約0.5mlの作業容量（working capacity）のいわゆるマイクロタイターウエルを用いて免疫アッセイ方法をししばし実施してきた。免疫アッセイ材料を取扱うための他のデバイスや装置については例えば欧州特許第031993号、英国特許第1571872号、英国特許第1584129号及び英国特許第1414479号の明細書中に記載されている。

特に、少量の試験サンプル^(試料)を操作し測定するための分析用デバイスについては従来技術の中で多数開示されている。

英国特許第2090659号明細書〔インストルメンテーション・

ラボラトリー社（Instrumentation Laboratory, Inc.）〕は、自動充填測定チャンネル（self-filling metering channel）及び例えば全血約10 μ l以上のサンプルを載置しうる^(リッパ)ヘリ又は注入口で構築され、毛管現象により（例えば）10 μ lを取り上げて透明な窓の下にフィルター層上の繊維性パッドが含有している試薬と反応させる試験片について記載している。結果は例えば呈色反応として裸眼で見ることができる。

英国特許第2036075号明細書〔エイチ・イー・メニエ（H E Mennier）〕、英国特許第1104774号明細書〔ジュー・ビー・ガラファー（J P Gallagher）〕、欧州特許第0057110号明細書、第0034049号明細書、第0010456号明細書〔コダック（Kodak）〕は全部、生物学的流体又は試験流体を操作するための毛細管チャンネル又はチャンパの大きさの使用についてのその他の点について記載している。

英国特許第1530997号明細書〔モンサント（Monsanto）〕は、例えば抗原抗体反応のような、被膜の反応により導波管（waveguide）の光伝達能を変化させる試験で使用できる被覆ファイバーの使用について記載している。WO 81/00912〔ブックス（Buckles）〕も又、ファイバーの表面又は周囲がコブを通過する光伝達を変化させるファイバー光学デバイスを記載している。

米国特許第3939350号明細書は、結合物質とプリズム表面の消えやすい波の相互作用と単独の全内部反射に関与する方法による固体の透明プリズム表面に結合した螢光物質の光学的測定について記載している。

欧州特許第0075358号明細書〔バツテル(Battelle)〕は、ファイバー中で対数的に増幅される光による指数関数的に崩壊する(消えやすい)外部放射線と、被覆とそれの相互作用について特に引用しており、この原理は欧州特許第0103426号明細書〔ブロック(Block)〕の免疫アッセイ試験デバイスにも取り上げられている。このデバイスでは、ファイバー又はプレート上に被覆した物質の螢光を捕える(fluorescent-tagged)結合相手(binding partner)を含有し、チューブ又はもう1つのプレートで仕切った毛細管の大きさのサンプル液量と接触する抗原又は抗体被覆光学ファイバー又はプレート内で、放出波長(emission wavelength)と共に螢光励起波を増強する。

本明細書に記載しようとする発明によると、便利に製造できる毛細管充填セルデバイスが提供され、非常に少量の液体サンプルを使用する特異的結合アッセイを特に容易にする。

本発明により、各々が毛細管作用によりキャビティ(cavity)内にサンプル液を吸引しうるに十分小さい大きさを有する1つ又は複数のキャビティを持つ、特異反応性サンプル収集試験デ

バイスであつて、キャビティの表面がデバイス内で実施しようとする試験に適當な不動態化試薬を有しており、前記表面は光伝導導波管として作用する透明な固体プレートの表面であり、キャビティの壁を形成し、前記プレートは実質的に光学的になめらかであり、例えばプレートの平面に対しある程度の横断角を持つか最も好ましくは垂直であるように横切っているエッジを有しているデバイスを提供する。

デバイスは便利なサンプルの収集を可能にし、デバイスに含有されている1つ又は複数の試薬とサンプルとの反応産物をその場で光学的に分析することを可能にする。導波管プレートは赤外、可視及び/又は紫外光を透過でき、デバイスを使用する1つの方法は、所望のアッセイ及びサンプル物質により種々の範囲で不動態化試薬に結合する螢光物質を準備し、次に得られた結合した螢光物質を光学的に測定することである。

デバイスの中の不動態化試薬は、アッセイ混合物の螢光又は冷光又は着色成分を結合しうる不動態化した抗原又は抗体でありうる。しかし、問題となる試験の種類にのみ依存する、光学的に測定しうる結果を与える方法で試験反応物質のもう1つの成分と特異的に相互作用しうる任意の不動態化物質が使用できることが理解される。

試薬を有する導波管表面に向かい合うキャビティの表面は、下記実施例に示すように、第2の同様な透明プレートで形成してもよい。

しかしながら、これは必要ではなく、ある型の試験では光吸収又は不透明又は反射する壁を毛細管キャビティに向く側に使用することが好適でありうる。

本発明のデバイスのいくつかの有用な実施例では、所望ではない物質を排除するために毛細管の大きさのキャビティ内へのサンプル液の取り込みの選択性を確実にするようフィルタ又は透析膜のような選択性バリアーを装着することができる。このような所望ではない物質は試験の性質によるが、赤血球のような細胞、細胞破砕物(cell debris)又は分散した高分子量物質を包含しうる。好適なフィルタは、例えば毛細管キャビティのサンプルの入口にある紙フィルタ又は毛細管キャビティに又はその内に固定したフィルタの片又は面又は透析膜物質でありうる。

毛細管キャビティ内の不動態化試薬、例えば不動態化した抗原又は抗体で被覆された領域が毛細管キャビティの全領域より非常に小さく、液がキャビティに入ると全サンプル液が不動態化試薬を通過しなければならないようにすることのできるものも本発明の範囲に含まれる。この方法では、毛細管セルの全領域での均一な吸着による結果より高い関連分析物質(relevant analyte material)(例えば相補抗体又は抗原)の表面濃度が得られ、試料-濃度効果が得られる。毛細管セルの表面の限定された小さい領域

(threshold area)にこのように不動態化被覆を行うことにより、所望の分析分質を選択的に停滞させ、サンプル液をバリアーを超えて通過させる選択的バリアーを実際に形成しうる。

本発明デバイスの使用においては、試験デバイスの収集表面上にサンプル液滴を載置してもよく、又はデバイスにある量の試料とすべき液体の中につけてもよい。補助的な試薬が必要なきときは、別に加えてもよく、又は使用に際し試料液と接触するデバイスの部分、例えば毛細管キャビティの表面又は存在すればフィルタの表面に乾燥した放出可能な形態で含有してもよい。

試験デバイスの更なる変形や特別な特徴は例えば下記に記す。

本発明により、(a)多数のデバイスの部分を提供すべきシート材料の表面上に不動態化した特異的反応性被膜を形成し、(b)前記シート材料と一緒に、多数のデバイスの各デバイスに、特異的反応性被膜と接触して毛管現象でサンプル液を収集し保持するための毛細管の大きさのキャビティを提供する追加構造を形成し、(c)シート材料を、各々が1つ又は複数の試料収集及び試験デバイスを提供する部分に分けることからなる、特異的反応試料収集及び試験デバイスの製造方法も提供する。この工程では、特異的反応性被膜は融合(confluent)又は連続又はパターン例えばパッチの2次元配列のような例えば区切れた部分に分かれていてもよい。このようなパッチを形成する場合には、例えば、先ず連続被膜を形成し、次に所望のパターン例えば区切つた部分の配列を残すように被覆の部分を除去する

ことにより、又は(例えばスクリーンプリントしたもしくはフレキシ印刷でプリントした)パッチの配列として作製することができる。

特異的反応性被膜は例えば珪酸グレーズ(glaze)のような固体の珪酸剤中に例えば保持された放出可能な抗原又は抗体、又はその誘導体の被膜のような放出可能な試薬の被膜、又は所望のアッセイに適する特異性を持つ免疫吸収剤を形成するために、珪酸剤で被覆することでもできる共有結合した抗原又は抗体又はその誘導体のような不動化された特異的結合物質であつてよい。追加構造は例えば適切な結合接着剤で第一のシート材料と結合しており、例えば約1mm未満の毛細管空間(capillary space)離れており、好ましくは規定の再生可能な量のサンプル液を毛細管現象によりシート間に取り込むことができるもう1枚のシート材料であつてよい。シート的一方又は両方が光学的に均一で一般に滑らかな表面を有する光に透過性のものであつてよい。シート材料例えばガラス、石英質又はプラスチック材料を線を引き、削つたり破いたりしてユニットに分けることができ、下記の実施例では、サンプル液を載置又は適用でき、そこからデバイスのキャビティにサンプル液が入りうる外側の装填表面(loading surface)を残すように行つている。外側の装填表面は好ましくは少なくともキャビティを充分満たすに充分な液体(例えば表

面上に広がつた1滴の物質の形状で)を含有又は保持しうる容量を有している。

本発明は本明細書に記載した方法の製品やその製品に使用にも及ぶ。

本発明デバイスのある実施例では、デバイスのキャビティはセルを形成する2つの向きあつた壁の間の、好ましくは接合した又は統合されたユニットからなる薄い平面キャビティでありうる。いくつかの場合には、例えば、デバイスは、液晶ディスプレイ製造の中間段階として得られるような未充填液晶ディスプレイデバイスの構造と同様な透明プレートが結合した構造を含有していてもよい。

従つて、本発明デバイスは、(好ましくは規定)量の(通常は水である)液体を毛細管現象で取り上げ保持することのできる開口部のある液体を保持しうるセルを形成するために、約1mm未満離れていて、一緒にシールされている向いあつた一組の透明プレートからなり、実施すべきアッセイに適する特異性を持つ(好ましくは不動化された)特異的結合剤の被膜をその内表面の少なくとも1つに持っている、特異的結合アッセイを実施するための、本明細書に記載した方法で製造できる半透明又は透明の(例えば使い捨ての)毛細管セルを有するものを包含

する。「規定量(defined volume)」とは、セル自身の形状と配位により実質的に決定されるものであり、過剰に適用したときにサンプル容量から明らかに決められるものではない。

本発明デバイスでは毛細管のギャップの大きさの正確に決めた(平行な)キャビティを有することが重要であり、毛細管のギャップにより取り上げられた全量を規定すべきことはそう重要ではない。重要なパラメーターはむしろ導波管の光学的試薬を持つ表面の単位面積当りに与えられる量であり、これはデバイス内のキャビティの向いあつた壁の平行な空間を正確に規定することにより与えられる。この空間は、ギャップを横切り試薬を有する表面への試料中の物質の拡散時間が大きくなる広すぎる空間と、ほんの少しの試料しか収容できない狭すぎる空間との中間である、例えば0.03~0.3mmのような、0.1mmのオーダーの約0.01~1mmの広範な範囲にあると好ましい。

キャビティを形成するに適する材料は例えば約1mm厚のシートのソーダガラスのようなガラス、シリカ及びアクリルプラスチック材料のようなプラスチックシート材料である。

毛細管セルを作るためにプラスチック材料を使用する場合には、例えば、リッジ(ridge)のようなスペーサーを有する正確な鋳型の形で使用して毛細管セルキャビティの成分の壁の空間を調整することもできる。

ある場合には、セルは、セルを充すに充分な量のサンプルを適用でき、そこから毛細管の作用により試料が容易に毛細管セル内に流入しうる外側の表面部分又はへり(lip)を有している。このようなへりは、試料を載置しやすい充分な大きさの表面積を与えるに十分な距離だけ、セルの開口を外側に向けて越えて、プレートの1つを伸ばすことにより容易に形成できる。所望に応じて、毛細管セルの入口に向けて導く、グローブ又はチャンネルのような液体伝導性の形状を与えることもできる。入口のもう1つの形は、毛細管セルの1つの壁の開口で形成されるもの、例えば試料を載置しうるセルの向い合う壁の部位に露出する穴である。本明細書に記載したような選択的バリア、例えばフィルターや透析膜はこのような入口開口内又はそれに隣接して置いてもよく、予め、乾燥した放出可能な試薬を与えておいてもよい。プラスチックの毛細管セルにこれらの特徴を持たせると特に便利であり、このような場合には鋳型プラスチックシート中に供給された正確に鋳込んだ開口は、得られた複数の毛細管セルの集合体を各々のセルユニットに分けるときに、垂直な光学的に平らな毛細管セルの端部を提供しうる。

充填用の開口と、セルが充填されるにつれて毛細管セルから空気が出られるように残すもう1つの開口を作るため、エポキシ樹脂の裏打ち (line) を用い、例えば矩形の毛細管セルの2つの向い合った側に添って樹脂を伸して開口を残すことによりセルをシールしることが好ましい。樹脂は固体粒子からなり、固体粒子が樹脂の上に沈むにしたがいプレートに所望の空間を与えるものが好適である。パロチニ (ballotini) 又はファイバーの直径のオーダーの小さな空間を調整するには、選択した毛細管ギャップに対応するか又は約100 μ 等の直径の実質的に単分散 (monodisperse) パロチニ (微細ガラス粒)、又は、例えば直径8 μ 、長さ50~100 μ の短いグラスファイバー (例えば、長いグラスファイバーをモーターグランドして、ふり分けにより残った長いファイバーを除去して作ったもの) のような粒子が好適である。一般に、非限定的な例示としては、5~500 μ の範囲の空間を選択する。単分散パロチニよりもファイバーの方が約50 μ 未満の直径を得やすいので、非常に狭いギャップにはファイバーが適しており、パロチニは広いギャップに好ましい。

米国特許第3 652 761号又は英国特許第1530 997号明細書に記載の任意の方法で共有や他の不動態化を達成できる。

これらの毛細管セルデバイスで実施しうる、特に例えば蛍光免疫アッセイのような免疫アッセイのフォーマットは従来技術の他の免疫アッセイの公知のフォーマットに対応する。例えば、このようなアッセイは抗原分析物が、例えば蛍光ラベルした抗原アナログのような蛍光競合物質と特異的免疫吸収剤上の結合部位を競合する競合的アッセイでありうる。又、分析物は蛍光リガンドの不存下で免疫吸収剤と接触することができ、この反応は処理した免疫吸収剤と蛍光リガンドとの間の接触により、例えば放出可能な被膜からゆつくりと又は遅れて放出されるに従って追跡できる。又、更に、例えばラベルした及びラベルしていない免疫複合体の混合物を形成した後、アッセイに関与する抗体を不動態化するために毛細管セル表面に不動態化した抗グロブリンの存在下に、分析物と溶液相結合相手と蛍光ラベルした競合物質、(例えば可溶性抗体と競合的蛍光ラベル抗原) との間で溶液相競合が実施できる。

特異的結合剤は特異的結合アッセイの目的に通常使用される任意のもの、特に抗原又は抗体から選択できる。好適例は抗グロブリン抗体、又はヒトアポリポ蛋白質A₁又はA₂に特異的な抗体、又は例えばエストロン-3-グルクロナイド又はプレグナジオールグルクロナイドに特異的な抗ステロイド抗体、又はコンカナバリンAのような非免疫学的結合剤又はチバクロムブルーである。このような不動態化のその他で行なわれている任意の方法で、ガラス又はシリカ又はプラスチック表面にそれらを不動態化できる。例えば、同時に或いは連続的にキャリア表面上に結合剤と蔗糖をコートし乾燥させるだけのものも有用であり得る。所望であれば、特にプラスチック材料の場合には、欧州特許第0 014 530号[ユニリーバ(Unilever)]明細書や本明細書中に引用した参考文献に記載された任意の方法で、そしてガラスやシリカのような石英質物質を包含する広範囲のキャリア材料については「工業用反応器用の不動態化酵素 (Immobilised Enzymes for Industrial Reactors)」[メッシング (Messing) 編、アカデミックプレス (Academic Press)、1975; 特にフィルバート (Filbert) の第3章]又は例えば

更にもう1つの例では、免疫吸収剤と蛍光リガンド (例えば両方抗体又は抗グロブリンテストでは各々抗原と抗グロブリン) の両者が試験を行つている分析物 (抗原又は抗体) に対し特異的なアフィニティを有しているサンドイッチテスト又は抗グロブリンテストを実施しうる。

更にもう1つの例では、より一般的なリガンド結合反応を利用でき、これは、例えばグルコース及び蛍光ラベルしたデキストランに競合的に結合するコンカナバリンAの不動態化層、又は蛍光及び非ラベルアルブミン又は他の蛋白質と特異的に結合するチバクロムブルー (cibacrom blue) のような染料層である。

同様に、化学的冷光又は生物学的冷光反応に関与するラベル、例えばルシフェラーゼ又は西洋ワサビペーオキシダーゼを用いて冷光アッセイを行うこともできる。

(以下空白)

本発明の具体例を例えば添附の第1～4図及び関連した記述で説明する。

第1図は、本発明の具体例による使い捨て式毛細管セルデバイスの概略断面図である。

第2図は、第1図のセルデバイスの概略平面図であり、第1図の断面線を示すための線1-1を含んでいる。

第3図は、第1図及び第2図の如き複数のデバイスの製造における中間段階を示す概略的な部分平面図である。

第3a図は、第3図に示す配置の変更例に対応する概略部分平面図である。

第4図は、本発明の具体例による特異的反応性の毛細管セルデバイスを示す概略透視図である。

第5図及び第6図は、第4図のデバイスの概略平面図及び断面図である。

第7図及び第8図は、第4～6図のデバイスの変形例である別のデバイスの対応する概略平面図及び部分断面図である。

第1～2図は、取扱いやすい大きさ、例えば約3mm×1.5mmの毛細管セルデバイス(capillary cell device)を示している。デバイスは、上部透明(例えばプラスチック、ガラス又はシリカ)プレート1及び下部透明(例えば類似のもの)プレート2

又はどちらかのプレート上に複数の層を積層及び/又は並行して(side-by-side)設けるように、このような層が1つ以上あつてもよい。同様な又は他の目的のためには、毛細管セルの内側表面を裏張りされている層7又は他の層が1つ又は複数の電導性層を含んでいてもよく、これは1984年6月13日付UK 8415018から派生した同日付の本出願人の係属出願に記載されている通りである。このような場合には、所望により結合層3とプレート表面との間を通る、セルの内側からセルの外側への伝導性トラック又はコネクタにより伝導的に外部に接続することができる。これらは、例えば、それ自身公知であり、例えば下記に参照した半導体や液晶ディスプレイの製造にしばしば用いられる伝導性トラックの従来の表面加工に使用されている方法で製造することができる。

セルを光学的測定に使用しようとするときには、プレート1又はプレート2のいずれか又は両方が透明又は半透明でなければならない。

第1図に示す断面図は、断面の線(line of section)が結合トラック3を介して伸びていないため離間しているプレート1及び2を表わしている。

複数の第1図及び第2図のようなセルの製造を第3図の、

(約1mm厚)からなり、これらは毛細管セルキャビティ4を形成するために、適当な(例えばエポキシ)接着剤の結合トラック3により1mm未満離間し且つ平行に対向するように固定されている。キャビティ4の両端は開放されており、プレート1のサイド5でセルの開口部を形成するように配置した結合3の第一の不連続部分を介して外側と連通している。別の不連続部分が結合3の他端に存在し、試料液をセルに入れるときに空気を排除させるための別の開口部となる。プレート2はプレート1より大きく、開口部から遠くへ伸びる部分6を有している。プレート2の部分6は、試料液滴をその上に適用できるプラットフォーム又は敷居(threshold)又は突出部分(lip)として働き、従つてこの液体は毛細管流により毛細管セルキャビティ4を充填される。このように載置するとキャビティ4は一定の適切な再現可能な容量の液体を引き付け、収容する。

毛細管セルを使用とする試験方法に関連する物質の層7を、毛細管セルの内表面に固定する。図面に示す実施例では、層7はプレート2上に担持された物質のパッチである。免疫アッセイの目的には、例えば免疫アッセイに適する固定化抗体のような固定化イムノソルバント(免疫吸収)感作領域でありうる。例えばプレート2と同様にプレート1上に1つの層を設けるか、

これらのセルの製造の中間段階を示す部分平面図で説明する。プレート2を作るためのガラス又は他の材料の大きなプレート8を洗浄し、結合しうる接着剤3のトラックと上記の任意の種類の材料のパッチ7を用い任意の適切な方法(例えば下記した方法)で被覆する。次いで、図示していない第2のプレートの上に適宜トラック3に対応する結合トラックを形成した後及び適宜他の任意の所望の材料のパッチ又はトラックを形成した後、第2のプレートをプレート8に固着し、接着剤を硬化させる。続いて、第3図の点線9で示す線及び上部プレートの対応する線(必ずしも線9と表示する必要はないが)に沿つてアセンプリを切り分けるか切断する。その結果、第1～2図に示すセルの如きセルが得られる。

第3a図は、例えば第1図及び第2図の如き毛細管セルデバイスの製造の別の好ましい中間段階を示す概略平面図を示している。第3図と第3a図との間の主要な相違点は、製造しようとするデバイスのパターンの形状や細部が異なるだけでなく、シート材料8に透し(waste)エッジ31が備えられており、この透しエッジ31に結合しうる接着剤トラック3aが備えられていることである。この目的は上部プレートと下部プレートとの間隔をより良く又はより都合良く調節することである。結合

可能な接着剤トラック3及び3aは上部プレートと下部プレートとの間隔を調整するために上記したファイバー又は微小粒子を含有しており、トラック3aを設置するとプレートのエッジで間隔が不規則になるのを防ぐことができる。

第3図及び第3a図の配置を、基板材料としてシート状ガラスを用いた場合で記載してきた。排他的にはないが特にプラスチックシートを使用する場合には、例えばスぺーサーリッジのような平らなシート材料以外のものを用いると便利であり、本明細書に記載した入口開口部及びフィルター設備(arrangement)は毛細管セルを組立てる前にこのようなシートの一部として組み入れることができる。

本発明に従って製造する他のデバイスの中で、第1図〜第2図の毛細管セルデバイスは所望であればいかなる便利な形の操作片(handling-piece)又はホルダーを具備していてもよく、このようなホルダーがセルデバイスと1つの片で形成されない場合には、この目的のためにこのようなホルダーを取りつけるための固定した又は解放自在な簡便な型のコネクション装置を具備させてもよい。

光学測定を便利にするためには、プレート1及び/又は2の1つ以上のエッジを実質的に光学的になめらかにしかつプレ-

ートの平面に垂直に作ることが望ましい。所望であれば、残りのエッジを黒色塗料又は他の光吸収材料で被覆してもよい。代りに又は更に、カーボンブラックのような吸光性顔料を、2枚のプレートを一緒に接合するために使用するエポキシのようなセメント中に配合してもよい。

使用に際して、第1図及び第2図のデバイスは、導波管又は光ファイバーのようにプレート1及び2の一方又は両方に沿って吸着させた螢光物質からの螢光を伝達できる。プレートの境界を横切る有効な光はインターフェイスに非常に近接して位置する無限小波(はみり波)(evanescent wave)により伝達せられる。所望であれば、生化学試薬を沈着させる前に、当該波長で波長厚さのオーダーの例えばシリカ又はフッ化マグネシウムの薄層をプレート上に形成して、境界を横切る光の伝達を改善することもできる。例えば通常臨界角度より約 1° 〜 5° 上の範囲であるプレート材料と試料液との間の境界の臨界角度に近い(及びやや上の)全内部反射に対応する路でプレート中を伝達される光を伴う無限小波の強度を最大にするように、誘電層の厚さと屈折率を一緒に選択するのが好ましい。誘電層の最適な屈折率は試料液のものにできるだけ近いものである。実際には、ガラスを使用するときにはフッ化マグネシウム($n=1.38$)又はシ-

リカ($n=1.46$)の誘電層を選択するのが最も一般的である。層の最適厚さは、プレート-誘電層の界面でのプレート内の光の入射角 P と媒質の屈折率で設定される。試料液を n_1 、プレートを n_2 、誘電層 n_3 で表わし、 L を使用した光の波長とすると、

$$t = L/4 \cdot \frac{\left[1 - 2/\pi \arccos \sqrt{\frac{n_3^2 - n_2^2 \sin^2 P}{n_3^2 - n_1^2}} \right]}{\sqrt{n_3^2 - n_2^2 \sin^2 P}}$$

である。

更に派生した別の実施例では、好ましくはシリカのような非常に薄い耐食性層をその上に真空蒸着させ、連続又は不連続の銀又はインジウムの薄い金属層を、一方又は両方のプレートに沈着させ、例えばそれ自身公知のビー・リードベルグ(B. Liedberg)ら、センサー及びアクチュエータ(Sensors and Actuators)、4(1983)299〜304に記載されているような表面プラズモン共鳴現象のような、このような層を利用するそれ自身公知の相当する他の光学的分析法にこのデバイスを使用しうるようにすることもできる。これらの例はいずれも、生化学的試薬の固定化層に、例えばプレート上の薄層中に蛋白質-蔗糖混合物を空気乾燥することにより形成される放出自在

な試薬被膜を補足又は前記被膜で置き換えることができる。これはデバイス中で行う特定の試験の化学特性により選択し組み合わせられる。実施しようとする試験の一部を形成しうる化学的又は結合反応は公知の結合反応試験の範囲に及び、固着の免疫吸収剤又は他の特異的結合吸着剤をベースとする任意の種類の酵素結合、螢光、ルミネッセンス、結合及び冷却(quenching)反応をも含んでいる。

第1〜2図の毛細管セルデバイスのようなセルデバイスを製造する手順と材料の詳細は本発明の具体例を更に説明する以下の実施例で示す。

実施例

各方向にいくつかのセルユニットを複数個有する、セル領域の2次元アレイを含むに十分大きく例えば約1mm厚さの(例えばソーダ)ガラスのシートを適当な方法、例えば洗剤及び超音波処理及び必要であれば公知の方法による溶媒蒸気での脱脂処理で、又は過酸化水素アンモニアと塩酸/過酸化水素での連続的熱処理(80℃)、水洗、例えば115℃で30分間の空気乾燥により清浄化する。次に以下の又は同等の手法により、所望の蛋白質又は他の被膜のパッチのパターンを形成する。公知の方法でガラスとシランをベースとするカップリング化合物と

を先ず反応させることにより、抗原又は抗体又は他の蛋白質を共有結合させる。ここで使用するように、このような試薬の適切なものは例えばアセトン中で約2% v/v の適当な濃度で使用する3-アミノプロピル化合物のような末端アミノ-アルキルトリメトキシシランである。他の方法では、USP 3 652 761号明細書中に実質的に記載されている別の試薬を代りに使うこともできる。アミノシラン試薬との反応後に、フラスコ(flass)上に固定化したアミノ末端を順次(例えば2% pH 7 の)グルタルアルデヒドと反応させ、過剰の試薬を除去し、固定化アルデヒド基を持つ活性化ガラスを、それ自身公知の手法で、溶液中の蛋白質(例えば、1mg/mlの抗体イムノグロブリン)と反応させる。選択自由で他の蛋白質は0.1~1mg/mlのオーダーの濃度で適用することができる。ここでは、37℃で約pH 9.5で2時間の処理が好適であることが判明した。ガラス表面上への好適な最終活性蛋白質の⁽⁵⁷⁾装填速度は例えば約0.5 μg/cm²でありうる。これで連続又は連続に近い層を構成すると考えられる。固定化層の量又は密度又は比活性は特有なアッセイの化学特性の感受性要件で決定され、これ自身は本発明の一部を形成

放出可能な(releasable)被膜は例えば蔗糖グレーズのような固体遷移剤と混合する等のそれ自身公知の組成を用いて適用できる。特に放出されるべき活性物質がそれ自身蛋白質である場合には、洗剤又は不活性蛋白質(又は溶解性塩又はバッファ物質)をこのような被膜に配合することが望ましく、それらが関与する試験反応との関係でこのような放出可能な被膜中の試薬が非常に過剰であることを避けることが特に望ましいことを本発明者らが知見している。

被覆工程の均一性は重要であり、適当であれば、放射線ラベルした及び/又は蛍光蛋白質を被覆し、次いで適宜更にかつ好ましくは別にラベルした結合剤と反応させる試験手順でチェックしうる。次に、被膜及びその結合能の均一性を表面蛍光測定及び/又は表面放射活性測定例えば研究用のガンマ線スキャナを用いてチェックすることができる。

その後にはガラス上の被膜をエッチングすることを望むならば、被覆したガラスを実質的に湿気のない狭い雰囲気内又は空気ドラフト内に置き、例えば被覆した鋼の空気ギャップを約1mm以下に減ずるために別の平らな不活性表面に近づけることができ

るものではない。例えば、強力なバッファ(0.1M アセート、0.5M NaCl, pH 4~5)中で洗浄し、次いで中性バッファ(pH 7~7.4)で洗浄した後pH 9~10で洗浄し、例えば中性のトリスバッファで中和して過剰の試薬を除去することができる。

蛋白質をガラスに接合させるための別の時により好適な方法は、ディー・ピー・ハーマン(DP Herman)ら、ジエー・クロマトグレル・サイ(J. Chromatogr. Sci.), (1981), 19 (9) 470~6 に従つて、エポキシ-シラン試薬、特にグリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン(例えばトルエン中2% v/v, 70℃で2時間半)を用いる方法である。エポキシシリレート化したガラスは蛋白質と直接反応できるので、この試薬についてはアルデヒド試薬の使用を省くことができる。

このような層-被覆表面に蔗糖のような固体遷移剤の被膜の如き安定化被膜を適用することが通常望ましい。このような被膜の適切な例は、例えば蔗糖溶液でプレート^(spin-coating)をスピニングし、空気乾燥することにより適用した8ミクロン厚の固体蔗糖被膜である。

次に、被膜をエッチングして取り去られる領域に対応するパターン、例えばグリッドパターンに紫外線でパターン化し、^(C. Abram 付添の発明の権利を主張する特許出願)た像を用いてガラスに照射(illuminate)すると、残存する蛋白質パッチのパターンが残る。照射は、例えばプレートから数センチメートル離れたGE 7-ワット水銀ランプを用い、約5~20分間行う。プレートに接近した(close)マスキングスは実体イメージングシステムにより照射パターンを製造できる。ここで使用する紫外線エッチングはジエー・パーニツ(J A Panitz), アイ・グーバー(I Glaver)がサーフェスサイエンス(Surface Science), 97 (1980) pp 25~42 に記載したU.V. エッチングプロセスと同じ原理によるものであり、前記文献を参照している。

次に、上部に一定間隔で置いたプレートと接合させるために、UV硬化性エポキシ接着剤を被覆例えばパッチ被覆したガラスプレート上に所望のパターンでプリントする。エポキシ接着剤は、それ自身慣用されているが本発明の一部をなすこととはなしルスクリーン技法により適用する。

エポキシ樹脂は、(例えばモーター内で長ガラス繊維をすりつぶし、篩分けして残存する長繊維を除去して作った)直径約20ミクロン、長さ約100~200ミクロンの短ガラス繊維を少量含んでいる。ガラス繊維の代りには、下記のように使用されるエポキシ樹脂中のパロチーニが好ましい。例えば100ミクロンのギャップを製造するためには、対応する大きさのパロチーニをエポキシ中に取り込ませる。プレート間の所望の空間よりわずかに厚い例えば10ミクロン、例えば100ミクロンの所望の間隔に対して約110ミクロンのエポキシ層をスクリーン印刷で載置することができ、別のプレートを静かに所定位置に押しつけてエポキシを軽く広げる。

所望であれば、同じ又は異なる蛋白質又は他の被覆材料でパッチワイズに被覆した又はそうでなければ被覆していない第二の類似のガラスシートに、エポキシ接着剤の第一のパターンの鏡像をパターンとして適用することもでき、次に2枚のシートを合わせて、硬化させるために必要であれば真空又は脱酸素状態にし、紫外線放射で硬化させる。像として、活性型で残しておくべき被覆蛋白質又は他の材料のパッチを防ぐパターンを用いて紫外線を適用する。

接着剤を硬化させた後、液晶デバイスの製造段階で使用され

る任意の便利な公知の方法、特に液晶ディスプレイデバイスの製造に関するCH-627 559号及び629 002号明細書に記載されている方法で、2枚のガラスプレートに線を刻み(scribe)、セルユニットに分割することができる。これらの明細書及び本発明の方法の対応するステップは必要な変更を加えて同様の方法で実施しうる。

この工程で得られるセルの便利な形態は実質的に平行に対向する2枚のガラス層からなり、これらは約5~500ミクロンの空隙を有し、間に介在する結合材料の不完全なフレームと一緒になつて、(液体の内方通過及び、多分空気の外方通過のための少なくとも1つの開口部を持ち)、規定量の水溶液を取り上げることのできる毛細管セルを形成する。その表面上に置かれた液滴の全部又は一部が、セル内に進入しうるようにするために、1枚のガラス層がセルの開口部を越えて伸長しているのが好ましい。

第4図には、本発明の具体例による特異的反応性毛細管セルデバイスの別の実施例が概略透視図で示されている。図示したデバイスは極く少量の液体試料をマイクロケミカルに試験するための使い捨て可能な一回だけ使用する試験デバイスである。第5図には対応する平面図、第6図には第5図の線6'-6'に沿つ

た概略断面図を示す[一定割合ではない(not to scale)]。

第4~6図のデバイスは、第1図のプレート1及び2に関連する上部ガラスプレート1及び下部ガラスプレート2からなる。第1図の7のような反応層は第4~6図に図示していないが、プレート2の表面に存在する。特別な試験の目的に必要であれば、放出可能な被膜として補助試薬をセルの対向壁すなわちプレート1の表面に置き、試薬がセルに入る試料液に溶解するようにしてもよい。使用者は、第4~6図のデバイスを、任意の簡便なプラスチック製造材料で作られ一般に41で示される支持及び操作フレームのハンドルピース(handle piece)42で操作する。アーム43は、セルアセンブリを支持しかつ試料セルの内容物を光学的に分析するための光学機器の操作部分と関連して位置付ける役割を有する。プレート2の端部44は光学的に透明であり、平らで、プレート2の平面に垂直であり、プレート1と2の間の毛細管セルの内容物から発する光はここから放出される。具体例ではプレート1と2の他のエッジは実用的に黒く塗布されており、第1図のトラック3に対応するエポキシ結合トラック3はプレート1と2を離間させるために100ミクロンのパロチーニ(ballotini)を含んでいる他、散乱(stray)光を最少限にするためにカーボンブラック顆粒をも含

有している。矩形の濾紙45を、試料受容入口を形成するためプレート1の長さを越えて伸長しているプレート2の部分46上に位置する。プレート1と2の間の毛細管ギャップの隣接した開放端47はプレート1と2及び結合トラック3で境界付けられた毛細管セル用入口であり、赤血球を通過させないよう十分に細かい等級のフィルター45は開放入口端47と接触して、好ましくは端部47でプレート2とやや重っている。フィルター45は所望であれば平行な線で連続するトラック3に沿つた接着剤で保持されており、所望であれば例えばpHパツファ塩のような放出可能な補助試薬を含浸させることもできる。プレート1を越えてプレート2の光学端44に伴っているプレート2の部分47を必要であれば疎水性被膜としてもよい。

使用に際し、試験すべき液体の試料、例えば全血の一滴をフィルター45で形成した入口ゾーンに適用し、このような滴(drop)から比較的細胞を含まない液体のある分量を毛細管セル中に引き入れる。ここで、必要な試験及びプレート1と2で形成した対向したセルの内壁の一方又は両方の上に調製された乾燥状態で予め含有されている対応する試薬の性質に通じた結合又は他の反応例えば酵素反応が起り、次に負荷されたセルは、例えば同時保属出願のUK特許出願第8415019に記載されてい

るような光学測定用光度測定器の中に組み入れることができる。

第7図と第8図は第4～6図のデバイスの変更例である。デバイスは2つのスナップオン(snap-on)操作・支持ピースを有しており、1つは41で示され、脱着自在であること以外は第4～6図の41に対応しており、別の操作・支持ピースはデバイスの光学端部にある側面リブ73上の取りはずし式スナップオンのはめあい(fit)であるハンドル72からなり、デバイスの光学端部は離間しているプレート1と2の同様な光学端部面44と74からなる。ハンドル42はハンドル72より堅いスナップオンのはめあいである。

第7図及び第8図のデバイスは固定ハンドル72とセパレートハンドル42を具備している。この状態では、セルロースナイトレート又はアセテートの微細フィルター又は透析膜75は、前述のようにプレート1と2及び結合トラック3の間で、更にプレート1と2の端部44と74に向つて液体が前方に拡散するのを限定する別の横方向黒色化エポキシ結合トラック3aによつても規定された毛細管セルの入口端部で露出しており、その結果プレート1と2の前方部分では各側に空気で境をしな導波管部分が構成されうる。トラック3と3aの間に2つの横ギャップが残り、フレーム73の2個対応する開口76により、

毛細管セルが試料液で充たされたとき空気が流出される。従つて、使用に際しては、デバイスをハンドル72で保持し、試料液の源中に使してフィルター75を介して毛細管セルを試料で充たす。この具体例では、プレート1と2の各々を上記のように製造した適当な抗体層のような固定化反応層7と77を担持している。必要であれば、反応層7と77の大きさを、フィルター75と線78との間のプレート1と2の各々の上に第7図に斜線で示した場所限定してもよい。このような配置では、静かに流入する試料液は、その各々が各リガンドを奪取できる反応層上を通過し、従つて、その表面での濃度は斜線部分で濃縮されうる。

試料を塩漬後、セパレートハンドル42を定位置にスナップオンし、より弱く取り付けられているハンドル72をはずし、それによつて上記と同様に固定するためにプレート1と2の光学端部44と74が露出するが、この場合には、デバイスの別別の光学導波管1と2及び各反応層7と77により1度に2つの異なる光学特性が測定できる。従つて、対応する光学測定装置は点線79で示す位置の仕切板にあり、プレート1と2から発する各光を分離する。

本明細書に記載した発明はその範囲内で多くの変更や変化が

可能であり、特に、前記の説明、添付図面及びその同等物の1つ及び多数の特徴のいずれか1つ以上を利用することにも及んでいる。

上記の記述に従つて製造した多くのデバイスはUK特許出願第8415019号(1984年6月13日)からの我々の係属出願に記載の方法や光度測定機器で光学的に測定すべき試料テストをするべく適用でき、上記特許出願の開示も参照として本出願に導入されている。

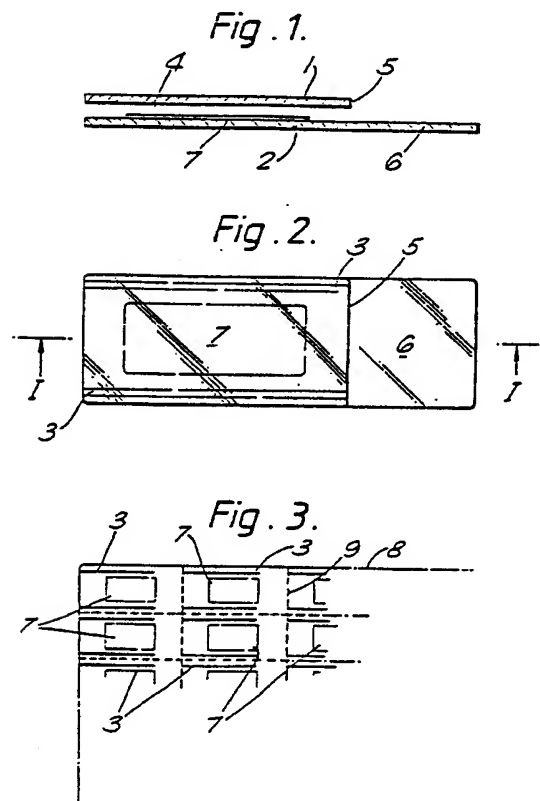


Fig. 3a.

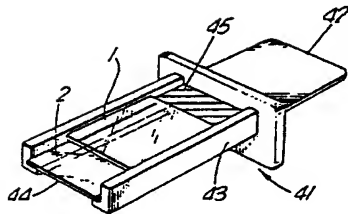
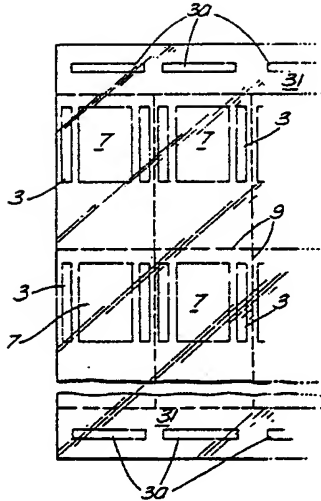


Fig. 4.

Fig. 5.

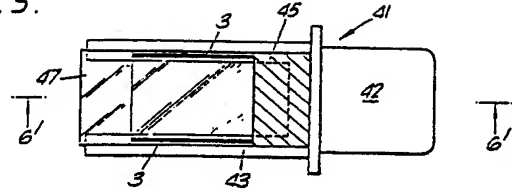


Fig. 6.

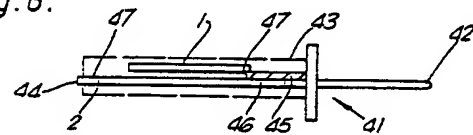


Fig. 7.

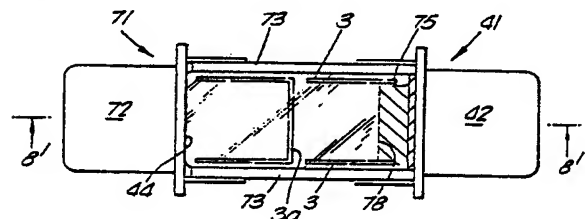


Fig. 8.



国际調査報告

PCT/GB 85/00259

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY, ARTICLE 17		
IPC: G 01 N 33/543; G 01 N 21/77		
2. FIELD SEARCHED		
Minimum Documentation Extent:		
Classification System:	Classification System:	Classification System:
IPC: G 01 N 33/53	G 01 N 21/55	G 01 N 35/00
G 01 N 33/543	G 01 N 21/77	
G 01 N 33/552	B 01 L 3/00	
Documentation Extent other than Minimum Documentation		
in the form of such Documents as indicated in the Table Searched:		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category:	Character of Document, with reference, where appropriate, to the relevant passages	Relevance to Claim No.
A	EP, A, 0103426 (M. BLOCK) 21 March 1984, see pages 11, 13, 25 (cited in the application)	1
A	GB	

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO.

PCT/GB 85/00259 (SA 9900)

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/GB 85/00259 (SA 9900)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 18/10/85

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0103426	21/03/84	JP-A- 59081560 US-A- 4447546	11/05/84 08/05/84
GB-A- 2090659	14/07/82	FR-A- 2487577 DE-A- 3151291 JP-A- 57132900 AU-A- 7909581	09/07/82 26/08/82 17/08/82 08/07/82
US-A- 4050895	27/09/77	DE-A- 2550420 GB-A- 1830997 CA-A- 1058414 JP-A- 51070694	13/05/76 01/11/78 17/07/79 18/06/76
EP-A- 0010456	30/04/80	US-A- 4254083 AT-T- 1366 CA-A- 1129498 EP-A, B 0010457 EP-A, B 0014797 US-A- 4213029 JP-A- 55059326 JP-A- 55071942 JP-A- 55074462 CA-A- 1119831 CA-A- 1131059 AT-B- E4249	03/03/81 15/08/82 10/08/82 30/04/80 03/09/80 11/11/80 02/05/80 30/05/80 05/06/80 18/03/82 05/10/82 15/08/83
FR-A- 2325920	22/04/77	BE-A- 846403 NL-A- 7610712 DE-A, C 2641097 LU-A- 75854 US-A- 4088448 AU-A- 1822976 AU-B- 497587 GB-A- 612505 CA-A- 1057078 JP-A- 52055679 GB-A- 1557984 JP-A- 57066343 SE-A- 7510863 SE-B- 399768	17/01/77 31/03/77 07/04/77 04/05/77 09/05/78 06/04/78 14/12/78 31/07/79 26/06/79 07/05/77 19/12/79 22/04/82 30/03/77 27/02/78

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

		AT-B- 376300	25/10/84
US-A- 4327073	27/04/82	None	
EP-A- 0034049	19/08/81	JP-A- 56125663 US-A- 4323536 CA-A- 1160863	02/10/81 06/04/82 24/01/84

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82